

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-101757

⑬ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)5月6日

G 01 N 33/66

D-8305-2G

C 12 Q 1/00

8412-4B

G 01 N 33/52

A-8305-2G

審査請求 未請求 発明の数 5 (全22頁)

⑮ 発明の名称 分析物の測定装置及び分析物濃度の定量方法

⑯ 特 願 昭62-200079

⑰ 出 願 昭62(1987)8月12日

優先権主張 ⑱ 1986年8月13日 ⑲ 米国(US) ⑳ 896418

⑳ 発 明 者 ロジャー フィリップ アメリカ合衆国、カリフォルニア 94303, パロ アル
ス ト, リチャードソン コート 845

㉑ 発 明 者 ジェフリー マクグロ アメリカ合衆国、カリフォルニア 95066, スコッツ パ
ウ リー, ハシエンダ ドライブ 291

㉒ 発 明 者 フランク ジュリク アメリカ合衆国、カリフォルニア 94402, サンマテオ,
シックスティーンズ アベニュー 142

㉓ 出 願 人 ライフスキヤン, イン アメリカ合衆国、カリフォルニア 94043, マウンテン
コーポレイティド ビュウ, ワイアンドット ストリート 2443

㉔ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外5名

最終頁に続く

明細書の抄写(内容に変更なし)

明 細 書

1. 発明の名称

分析物の測定装置及び分析物濃度の定量方法

2. 特許請求の範囲

1. 膜と、吸光性色素生成物を生成するシグナル生成系とを用いて血液試料中のグルコースを定量する方法であって、該シグナル生成系が該膜に結合しており、該色素生成物の量を該膜の表面での反射率測定により定量する方法において、

全血液を該膜の表面に塗布し、該膜の、該試料を塗布した表面以外の膜表面で反射率の測定を行うことを特徴とする血液試料中のグルコースの定量方法

2. 該シグナル生成系が、赤血球が吸収する波長とは異なる波長で光を吸収する色素生成物を生成し、且つ該赤血球の吸収波長と該色素生成物の吸収波長の二つの異なる波長で反射率測定を行う特許請求の範囲第1項に記載の方法。

3. 該二つの波長が、それぞれ約 635nm及び 700nmである特許請求の範囲第2項に記載の方法。

4. 該シグナル生成系が、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ及びHBTB-DHABインジケータからなる特許請求の範囲第1項に記載の方法。

5. 該膜の表面が、ポリアミドである特許請求の範囲第1項に記載の方法。

6. 該ポリアミドが正に帯電しており、且つグルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ及びHBTB-DHABインジケータが該方法の実施に先立ち、該膜に結合される特許請求の範囲第5項に記載の方法。

7. 全血液試料を、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ及び反応生成物を生成することのできる色素インジケータが結合した親水性マトリックスからなる試薬要素に塗布し、

該試料を該膜に浸透させ、

該膜への該試料の浸透度の検出及び反射率の減少による所定の時間の反射率の読み取りのための計時を開始し、及び

該色素生成物の吸光性から生じる反射率の追加的変化により、該試料中のグルコースを定量する

工程を包含するグルコースの定量方法。

8. 該色素インジケータが、HBTB-DNABインジケータである特許請求の範囲第7項に記載の方法。

9. 該親水性膜が、ポリアミド表面を有する特許請求の範囲第7項に記載の方法。

10. 該親水性膜が、正に帯電している特許請求の範囲第9項に記載の方法。

11. 多孔質マトリックスの第一表面で最初の反射率測定値の読み取りを少なくとも一回行った後、該マトリックスの第二表面に試料を塗布し；

該第一表面で、追加の反射率の読み取りを少なくとも一回行い；

該追加の反射率の読み取り値を該最初の反射率の読み取り値と比較し、該試料が該第一表面に到達することにより生じる反射率の低下が所定の値になったとき、計時測定を開始し；及び

該追加の反射率の読み取り値と該最初の反射率の読み取り値と差が所定の値になった後の所定の時間に、反射率の測定値の読み取りを行うこととなる、反射率測定装置での測定の計時を開始す

る方法。

12. 該表面は最初は乾燥状態にあり、且つ液状のアッセイ媒体が該マトリックスの該第一表面まで浸透したときに、該追加の反射率の読み取り値と該最初の反射率の読み取り値との間に差が生じる特許請求の範囲第11項に記載の方法。

13. 該マトリックスが、色素前駆体を結合している特許請求の範囲第12項に記載の方法。

14. 分析すべき吸収液体を含むことのできる多孔質マトリックスを除去可能に含有するようにしてある、透光用窓を有する容器；

該マトリックスの表面を照明する手段；

該マトリックスから反射する二つの異なる波長の光を検出する手段；

反射光の読み取り値を集め、反射光の第一波長での分析物あるいは反応生成物の吸光度及び反射光の第二波長でのバックグラウンドの吸光度に基づいて該液体中の分析物の濃度を計算する制御手段；及び

該濃度を報告する手段、から構成される液体中

の分析物の定量用測定装置。

15. 該装置が、更に該照明手段、検出手段、制御手段及び報告手段に作動可能に接続された自給式電源からなる特許請求の範囲第14項に記載の装置。

16. 該照明手段及び二つの異なる波長の光を検出する手段が、共に：1)異なる波長の二つの光源と一つの光検出器；あるいは2)多色光源と、異なる波長の光の検出に限定された二つの検出器からなる特許請求の範囲第14項に記載の装置。

17. 該光の第一波長が、690～710nmであり、該光の第二波長が、625～645nmである特許請求の範囲第14項に記載の装置。

18. どちらかの波長の光の反射率の初期減少に基づいて時限回路が該制御手段により始動され、該減少が、該液体を該照明手段により照明される表面以外のマトリックス表面に塗布した後、該液体が該マトリックスに浸透することにより生じる特許請求の範囲第14項に記載の装置。

19. 該制御手段により、該反射率の初期減少の

後所定の間隔で少なくとも一回以上反射光の読み取りがなされる特許請求の範囲第14項に記載の装置。

20. 該制御手段が、液体を該試薬パッドに塗布する前の該試薬パッドでの反射率の読み取り値を集め且つ記憶することができる特許請求の範囲第19項に記載の装置。

21. 該制御手段が、更に該試薬パッドからの反射光の不存在下でのバックグラウンド検出器電流の読み取り値を集め且つ記憶することができる特許請求の範囲第20項に記載の装置。

22. 分析物検出モードにおける該制御手段に電力を供給すると、該制御手段が、自動的に該検出器からの一連の反射率の読み取り値を集め且つ比較し、反射率の低下を検出するや時限回路を始動し、該反射率の低下後所定の間隔で反応反射率の読み取り値を集め、該反応反射率の読み取り値から該液体中の分析物の濃度値を計算し、且つ該濃度値を該報告手段に移行させる特許請求の範囲第21項に記載の装置。

23. 該分析物検出モードに先立つベース反射率モードにおいて、該制御手段に電力を供給すると、該制御手段が、液体の該マトリックスへの塗布に先立ち、該マトリックスでのベース反射率の読み取り値を求め且つ記憶し、又、分析物検出モードにおける該制御手段に電力を供給すると、該制御手段により該反応反射率の読み取り値から該ベース反射率読み取り値が差し引かれ、得られる値を用いて該制御手段が計算を行う特許請求の範囲第20項に記載の装置。

24. 不活性多孔質マトリックスと、分析物との相互作用により吸光性反応生成物を生成することのできる試薬系からなる試薬要素であって、該試薬系が分析すべき液体を該試薬要素に塗布する前に該マトリックスの孔に含浸させたものである該試薬要素の第一表面で、ベース反射率を定量化し、

反応反射率を測定する第一表面以外の該試薬要素の第二表面に該液体を塗布した後であって、且つ該液体が該試薬要素を通過して該第二表面から該第一表面に移行した後、該試薬要素での反応反

射率を定量化し、

該液体の塗布の後、該反応反射率を測定するのに用いる光の波長とは異なる光の波長を用いて、該試薬要素の第一表面での干渉反射率を定量化し、及び

該反射率の測定値から該液体中の分析物の濃度を表す値を計算で求めることからなる、液体中の分析物の濃度を測定する方法。

25. 該マトリックスが、ポリアミドから形成された表面を有する特許請求の範囲第24項に記載の方法。

26. 該マトリックス中の孔の平均径が0.2～1.0μmであり、且つ該液体が全血液である特許請求の範囲第24項に記載の方法。

27. 該試薬が、グルコースと反応して吸光性反応生成物を生成する特許請求の範囲第26項に記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、水性流体、特に全血液中の化学成分

及び生化学成分(分析物)の比色定量用試薬装置及び試験方法に関する。好ましい一態様によれば、本発明は、全血液中のグルコース濃度を比色的に測定する為の試験装置及び試験方法に関する。

(従来の技術及び発明が解決すべき問題点)

着色水性流体中、特に全血液及び尿素などの着色生体液並びに血清及び血漿などの着色生体液試薬中の化学成分及び生化学成分の定量化が、益々重要性を増している。これについての重要な用途としては、医療における診断及び治療、並びに治療用薬物、中毒物、危険化学薬品等への暴露に関する定量化が挙げられる。ある場合には、測定物質の量が、1デシリットル当たり1マイクログラム以下の範囲といったように非常に少量であるか、あるいは正確に定量化するのが困難な程度の量であり、従って、用いられる装置が、複雑であり且つ熟練した研究員のみしか用いることが出来ないことがある。この場合には、一般に、試料採取後数時間ないしは数日間、結果を入手すること

ができない。又、他の場合には、迅速あるいは即時情報表示装置を据えつけてある実験室外で、素人のオペレーターが、この試験を日常的に、迅速に且つ再現性良く行う為の技量に重点が置かれることがある。医療において一般的に行われる試験のひとつとして、糖尿病患者による血中グルコース濃度の測定が挙げられる。現在では、糖尿病患者が個々の場合に応じて種類及び重症度によって1日2～7回血中グルコース濃度を測定することを勧めている。このようにして得られたグルコース濃度のパターンに基づいて、患者と医師が協議のうえ、食事、運動及びインシュリン摂取量を調整して、糖尿病をよりよく治療する。このような場合には、明らかに、患者が測定値についての情報を直ちに入手できるようにしてはならない。

現在米国で広く用いられている方法では、1967年1月17日発行されたマスト(Mast)による米国特許第3,298,789号に記載されている種類の試験用品が用いられている。この方法では、まず、採取したばかりの全血液の試料(一般に20～40μl)を、

グルコースオキシダーゼ及びペルオキシダーゼ活性を有する酵素系含有のエチルセルロースで被覆した試薬パッド上に置く。この酵素系をグルコースと反応させ過酸化水素を放出させる。パッドには、指示薬も含有されており、ペルオキシダーゼの存在下で過酸化水素と反応して、試料中のグルコース濃度に比例した強度で発色する。

他の良く用いられている方法では、同様の化学反応を利用しているが、エチルセルロースで被覆したパッドの代わりに、酵素と指示薬を分散した耐水性フィルムを用いている。この種の装置は、1971年12月28日発行されたレイ(Roy)等による米国特許第 3,630,957号に記載されている。

上記の両方の場合において、試料は、特定の時間(一般に1分間)、試薬パッドと接触状態に置かれる。その後、前者の場合血液試料を水流で洗浄して拭き取り、一方、後者の場合フィルムをぬぐい取る。次に、パッドあるいはフィルムを吸い取って乾燥し、評価する。評価は、発生した色カラーチャートと比較するか、パッドあるいはフィ

ルムを拡散反射率測定器中に入れ、色の強度を読み取ることにより行う。

上述の方法は、長年グルコース濃度監視用に用いられてきたが、幾つかの限界がある。例えば、フィンガースティック(finger stick)試験の割りには、必要な試料のかさがかなり大きく、毛細血管の血液が容易に出ないある人々の場合には、それだけの試料を採取することが困難である。

更に、これらの方法では、結果が、試料と試験試薬との反応の絶対的な程度に関係する色の読み取りの絶対値に基づいて出されるために、他の素人オペレータ用簡便比色定量法と同様の限界事項がある。即ち、決められた時間間隔で反応後、試料を洗い流すか、あるいは試薬パッドを拭き取らねばならず、使用者は、決められた時間間隔の終わりには待機して必要な時間に拭き取るか、あるいは水流をかけなければならない。又、試料を取り出して反応を停止するために、得られる結果、特に家庭での使用者の手法に曖昧さが生ずる。つまり、洗浄し過ぎると結果が低くなり、一方、洗

淨が足りないと結果が高くなる。

素人オペレータ用簡便比色定量法によくある他の問題は、血液を試薬パッドに塗布するときにタイミングシーケンスを行う必要があることである。使用者は、一般に、フィンガースティック(finger stick)を行って血液試料を得、指から得た血液を試薬パッドに塗布すると同時に他の手でタイミングサーキット(timing circuit)を始動する必要がある。従って、両方の手を同時に使用する必要がある。血液を試薬パッドに塗布するちょうどそのときに、確実にタイミングサーキットの始動が必要なこともあり、このことはとりわけ困難である。従来の方法全てにおいて、測定結果を得るために付加的操作あるいは付加的サーキットリが必要である。従って、反射率読み取り器をこの面において簡便化することが望ましい。

赤血球等の着色成分が存在すると絶対値の測定を妨害することがあり、従って、最も広く実施されている上記の二つの従来の方法においては、赤血球を排除する必要がある。米国特許第 3,298,789号

に記載されている装置では、エチルセルロース膜により、赤血球が試薬パッドに入り込むのを防止している。同様に、米国特許第 3,630,957号では、耐水性フィルムにより、赤血球の侵入を防止している。両方の場合において、洗浄あるいは拭き取りの操作も、妨害の可能性のある赤血球を、測定前に除去する働きをする。

従って、反射率の読み取りを行う反射率ストリップから、液体の過剰分を除去する必要のない、血液等の着色液中の分析物を検出するシステムの必要性が示されている。

(問題点を解決するための手段)

本発明によれば、シグナル生成系を含有する親水性多孔質マトリックスと液体マトリックスに浸透してマトリックスの反射率が変化すると始動する反射率測定装置から構成される、診断測定用の新規な方法、組成物及び装置が提供される。本発明の方法は、試料、一般的には全血液を、赤血球などの大きな粒子を除去するマトリックスに、一

般的にはマトリックスを装置に存在させた状態で追加することからなる。シグナル生成系は、試料中の分析物の存在に関係するマトリックスの反射率をさらに変化させる生成物を生じる。

本発明による診断測定システムの代表例としては、血液に由来する妨害及び使用誤差を生じる複雑なプロトコルなしに行うことができる全血液中のグルコースの定量が挙げられる。

試薬要素

本発明により、特に酵素生成物として過酸化水素を生成する酵素基質を含むグルコースなどの分析物の定量用の信頼性があり且つ操作の容易な装置を用いる、迅速性及び簡便性の面で改善された方法が提供される。本発明の方法は、少量の全血液を多孔質のマトリックスに塗布し、マトリックスを十分に浸す工程を包含する。マトリックスには、マトリックスの反射率の最初の変化をもたらす生成物を生じるシグナル生成系の一種又はそれ以上の試薬が結合している。血液が塗布される時には、マトリックスは一般的に反射率測定装置中

に存在する。液体試料がマトリックスに浸透し、測定表面で最初の反射率の変化が生じる。最初の反射率の変化の後、一回又はそれ以上の回数読み取りを行い、反応生成物の生成の結果起こる測定表面あるいはマトリックスにおける反射率の異なる変化と試料中の分析物の量とを関連づける。血液における測定、特にグルコースの測定の場合には、一般的に、測定媒体として全血液を用いる。マトリックスには、過酸化水素を生成するオキシダーゼ酵素が含有されている。又、マトリックスには、更に第二酵素、特にペルオキシダーゼ、及びペルオキシダーゼに結合した吸光生成物を生じる色素系が含有されている。吸光生成物が反射率シグナルを変化させる。全血液の場合、二つの波長で読み取りを行うが、そのうちの一つは、ヘマトクリット、血液の酸化や、他の結果に影響を及ぼす変数によって生じるバックグラウンドを差し引く為に用いられる波長での読み取りである。

用いられる試薬要素は、マトリックスとマトリックス内に含有されるシグナル生成系部材からな

っている。又、この試薬要素には、種々の用途に応じて他の成分を含有させてもよい。この方法では、一般的に、必要に応じて行う抗凝固剤以外の前処理をしない少量の血液をマトリックスに塗布する必要がある。測定の時間的調節は装置により行われ、流体がマトリックスに浸透すると、自動的にマトリックスの反射率の変化を検出する。その後、反応生成物の生成の結果生じる所定の時間にわたる反射率の変化を、試料中の分析物の量と関連づける。

本発明において考慮すべき最初の成分は、好ましくはパッドの形状をしている試薬要素である。この試薬要素は、不活性の多孔質マトリックスと、分析物と反応して吸光反応生成物を生成し、多孔質マトリックスの孔中に浸透することのできるシグナル生成系からなる。このシグナル生成系は、マトリックスを通る液体の流れをあまり妨げないものである。

容易に反射率の読み取りが出来るように、マトリックスが實質的に滑らかで且つ平らな少なくとも

も一つの面を有することが好ましい。一般的には、マトリックスは、少なくとも一つの滑らかな平らな面を有する薄板状に成形したものである。使用の際、分析すべき液体試料をこの薄板の一つの面に塗布すると、存在する測定物質が、毛管作用、吸い上げ作用、重力流動作用及び/又は拡散作用により試薬要素を通過して進む。マトリックスに存在するシグナル生成系が反応し、吸光反応生成物を生じる。入射光は、試薬要素の試料を塗布した以外の位置に当たる。光は、試薬要素の表面から拡散反射光として反射する。この拡散光を集め、例えば、反射率分光光度計の検出器で測定する。次に、反射光の量を、通常試料中の分析物の量の逆関数である試料中の分析物の量と関連づける。

マトリックス

試薬要素を生成するのに必要な各成分について以下説明する。まず最初に、マトリックス自体について説明する。

マトリックスは、場合により試薬が共有結合あるいは非共有結合により結合する親水性マトリッ

クスである。このマトリックスは、水性媒体がそこを流れて流れることのできるものである。又、マトリックスは、タンパク質成分がタンパク質の生物学的活性、例えば、酵素の酵素活性にあまり悪影響を与えることなく結合することのできるものである。マトリックスは、タンパク質が共有結合する程度に応じて、共有結合の活性部位を有するか、あるいはこの分野において公知の手段で活性化してもよい。このマトリックス組成物は、反射性であり、且つマトリックスからの反射に十分影響を与えることのできる吸光色素を、空隙部あるいは表面に生成させるに十分な厚みを有するものである。又、マトリックスは、必要とされる構造及び物性を与える均一組成物あるいは基板上に形成した被膜の形態でもよい。

マトリックスは、通常ぬれても変形せず、従って、最初の形状及び大きさを維持する。又、マトリックスは、所定の吸収性を有し、吸収容量は適当な限度内に設定され、吸収容量の差は、通常約50%未満、好ましくは10%以下に保たれる。

このような多孔質マトリックスを製造する好ましい方法としては、親水性ポタマーを不織布コーアにキャストする方法がある。このコーア繊維は、ポリエステル類及びポリアミド類などの上記の結合性及び強度を生じる繊維状物質であればよい。後で詳細に説明する吸光性反応生成物を生成する試薬は、マトリックスの孔中に存在するが、マトリックスを封止せず、分析すべき血液などの測定媒体の液状部分がマトリックスの孔を流れて流れ、一方、赤血球などの粒子は表面で保持される。

マトリックスは、実質的に反射性のものであり、反射性基底を用いなくとも拡散反射を生ずる。好ましくは少なくとも25%、より好ましくは少なくとも50%のマトリックスへの入射光が反射し、拡散反射として放出されるものがよい。マトリックスの厚さは、通常約0.5mm未満、好ましくは約0.01~0.3mmである。0.1~0.2mmの厚さが、特にナイロン製マトリックスの場合には、最も好ましい。

マトリックスは、必須条件ではないが、一般的

このマトリックスは、通常の方法で製造できる程度に十分な湿潤強度を有するものである。又、マトリックスは、非共有的に結合した試薬がマトリックス表面に比較的均一に分布できるものである。

マトリックス表面を構成するものの代表例としては、特に全血液を含有する試料の場合には、ポリアミドが挙げられる。ポリアミドは、好ましくは炭素数4~8の単量体の縮合重合体であり、この場合の単量体は、ラクタム類、あるいはジアミンとジカルボン酸の組み合わせからなるものである。又、これらに匹敵する性質を有する他の重合組成物も使用することができる。これらのポリアミド組成物は、変性して帯電構造を与える他の官能基を導入し、マトリックス表面を中性、正、あるいは負に帯電させたり中性、塩基性あるいは酸性状態にしてもよい。好ましいマトリックス表面は、正に帯電したものである。

全血液を使用する場合には、好ましくは0.1~2.0mm、より好ましくは0.5~1.0mmの平均孔径を有する多孔質マトリックスが好ましい。

に、物理的形態と剛性を付与するためにホルダーに取りつけられる。第1図は、本発明の一態様であり、薄い親水性マトリックスパッド11を接着剤13によりプラスチック型ホルダー12の一端に配置する。この接着剤により、試薬パッドは直接且つ堅固にホルダーのハンドルにとりつけられる。試薬が試薬パッドの一つの面に塗布され、光が地面から反射されるように、試薬パッド11が取り付けられるプラスチック型ホルダー12の部分に穴14が設けられる。

試験されるべき液体試料は、パッド11に塗布される。一般的に、試料が、本発明で用いられる代表例である血液である場合には、試薬パッドの表面積は、5~10mm²の試料が十分にしみ込む容積であり、約10mm²~100mm²、特に好ましくは10mm²~50mm²のオーダーである。

従来技術では、拡散反射率測定を、反射性基底をマトリックスに取りつけるか、あるいはマトリックスの裏面に配置して行ってきた。しかしながら、本発明の実施にあたっては、試薬要素の一部

分としてでも、そのような基底は必要とせず通常は配置しない。

第1図からわかるように、支持体に試薬パッド11が保持され、試料が試薬パッドの一つの面に塗布され、また、光の反射率が試薬を塗布した位置と逆の試薬パッドの面から測定されるようになっている。

第2図は、基底のハンドルに穴がある面に試料を塗布し、一方、試薬パッドの他面で光を反射させ測定するシステムを示す。これに関連して、図に示したものの以外の構造のものを用いてもよい。パッドは、図示したように照らされる種々の形状及び形態のものであってもよい。このパッドは、少なくとも一表面、通常は二表面上で近接できる。

親水性層(試薬要素)は、従来のいずれの手段、例えば、ホルダー、クランプあるいは接着剤で支持体に取り付けることができる。しかしながら、基底に接着するが好ましい。この接着は、非反応性接着剤を用いて、親水性層に用いている材料の一部を取り込むに十分な程度に基底表面を融解さ

せる熱的方法、あるいは同様に親水性試料パッドを融解して基底と一体にするマイクロ波又は超音波接着法により行うことができる。これに関連して、組み取りを行う位置では接着剤の必要性がないのでこのようなことが起こりそうにないが、上記の接着剤それ自体が試料反射率の測定あるいは測定すべき反応を実質的に妨害しないように行うことが重要である。例えば、接着剤13を基底ストリップ12に塗布し、その後、まず穴14をストリップと接着剤との結合体にあけ、その後、試薬パッド11を、穴14に近接した接着剤に貼り付けて、試薬パッドの周囲部分が基底ストリップに結合するようにすることができる。

化学試薬

シグナル生成系としては、試料中の分析物と反応し、測定媒体が十分な吸収を示す波長以外の波長で特徴的な吸収を示す化合物を直接的ないしは間接的に生成することのできるものであればいずれのものも用いることができる。基質(分析物)が酵素を利用するオキシダーゼ酵素と反応するよ

うな反応方法を実施するには、ポリアミドマトリックスが特に有効である。これらの反応においては、生ずる生成物が、更に色素中間体と反応し所定の範囲の波長を吸収する色素を、直接的あるいは間接的に生成する。例えば、オキシダーゼ酵素が基質を酸化し、反応生成物として酸化色素を生ずる。次に、この過酸化色素を触媒反応あるいは非触媒反応において、色素中間体ないしは色素前駆体と反応させ、この中間体ないしは前駆体の酸化体が着色生成物を生成したり、又は第2前駆体と反応して最終色素を形成する場合もある。

分析物及び代表的試薬の例としては、次に示す物質を挙げることができるが、本発明は、これらのものに限定されるものではない。

分析物及び 試料の種類	試 薬
血液、血清、尿あるいは他の生体液体、ワイン、果汁	グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ及び酵素受容体。酵素受容体として

あるいは他の着色水性液体中のグルコース。全血液が特に好ましい試料である。

は、例えば、 α -ジアニジジン(1)、 α -トリルジン、 α -トリジン(1)、ベンジジン(1)、2,2'-アジノジ-3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸-(6)(1)、3-メチル-2-ベンズチアゾニンヒドラゾン+N,N-ジメチルアニリン(1)、フェノール+4-アミノフェナゾン(1)、2,4-ジクロロフェノールのスルホン化物+4-アミノフェナゾン(2)、3-メチル-2-ベンズチアゾリンヒドラゾン+3-(ジメチルアミノ)安息香酸(3)、2-メトキシ-4-アクリルフェノール(4)及び4

—アミノアンチビリンジメ
チルアニリン(5)が挙げ
られる。

備考：下記に示す文献に記載のものが用いられる。

- (1) クリニカル・ケミストリー(Clinical Chemistry)、リヒテリヒ及びコロombo (Lichterich and Colombo)、第 367 頁に記載のもの及びそこに引用されている文献に記載のもの
- (2) アナリスト(Analyst)、97 (1972) 142-5
- (3) アナル・バイオケム(Anal. Biochem)、105、(1980) 389-397
- (4) アナル・バイオケム(Anal. Biochem)、12、(1977) 597-601
- (5) クリニカ・ケミカ・アクタ(Clinica Chemica Acta)、75 (1977) 387-391

分析方法

本発明の分析方法は、拡散反射率により測定し

たときの吸光度の変化に基づくものであり、この変化は、測定すべき試料中に存在する分析物の量に依存する。又、この変化は、時間をおいて2回以上測定した場合の分析試料の吸光度の変化を測定することにより定量することができる。

測定において考慮すべき最初の工程は、マトリックスへの試料の塗布である。実施に当たっては、分析を次のように行うことができる。まず、分析物を含有する水性流体の試料を得る。血液の場合には、例えば、フィンガー・スティック(finger stick)により得ることができる。マトリックスの反射率を測定する部分を浸潤するのに必要な量以上のこの流体(即ち、約5~10 μ l)を試料要素あるいは試験装置の要素に塗布する。この際、下記より明らかなように、従来技術において一般的に必要とされているような、同時にタイマーを始動することは必要ない。流体の過剰分は、軽く吸い取って除去することができるが、このような除去も必ずしも必要ない。試験装置は、一般に、試料の塗布に先立ち、吸光度、例えば、反射率による

発色強度読み取り用機器の中に取りつけられる。試料の塗布後ある時点で吸光度を測定する。本明細書において「吸光度」とは、単に可視波長範囲内の光のみではなく、赤外線や紫外線などの可視波長範囲外の光にも当てはまる。これらの吸光度測定値から、発色率を決定して分析物濃度を求めることができる。

測定装置

適当なソフトウェアを搭載した拡散反射率吸光度計などの好ましい機器では、ある所定の時間に反射率を読み取り、反射率の変化率を計算し、アッセイ要因を用いて、水性流体中の分析物の濃度を自動的に出力する。このような装置の略図を第2図に示す。第2図には、基底12とそこに貼られている試薬パッド11から構成される本発明の試験装置を示す。光源14、例えば、高強度発光ダイオード(LED)により試薬パッド上に光線が投射される。この光のかなりの部分が反応生成物の不存在下において(少なくとも25%、好ましくは少なくとも35%、より好ましくは少な

くとも50%)試薬パッドから拡散して反射され、光検出器15、例えば、受ける光に比例した出力電流を生じるホトトランジスタにより検出される。必要に応じて、光源14及び/又は検出器15が特定の波長光を発生したり、それに応答したりするようにすることができる。検出器15の出力が、増幅器16、例えば、ホトトランジスタ電流を電圧に変換するリニアICへ供給される。増幅器16の出力が軌道・保持回路17に供給される。この回路は、増幅器16からのアナログ電圧を追跡し、マイクロプロセッサ20からの指令を受けると、その時のレベルで電圧を固定し保持する。アナログ・デジタル変換器19は、軌道保持回路17からのアナログ電圧を捕らえ、マイクロプロセッサ20の指令を受けるとそれを、例えば、12ビットの2進デジタル数に変換する。マイクロプロセッサ20は、デジタル処理回路でよい。これは、次のような制御機能を行う：1) システム全体の時間調節；2) アナログ/デジタル変換器19の出力の読み取り；3) プログラム。

アンド・データメモリ21とともに、所定の時間間隔で測定される反射率に対応するデータを記憶する；4) 記憶した反射率から分析物濃度を計算する；及び5) 分析物濃度のデータを表示装置22に出力する。メモリ21は、データ及びマイクロプロセッサ操作プログラムを記憶するデジタル集積回路でよい。報告装置22は、種々の形態のハードコピー及びソフトコピーをとることができる。通常は、この装置は液晶あるいは発光ダイオード表示装置などの視覚的表示装置であるが、テーププリンター、可聴信号などであってもよい。又、この機器に、必要に応じて、始動・停止スイッチをつけたり、試料塗布、読み取りなどの時間を示す可聴あるいは可視時間出力を出すようにしてもよい。

反射率切り換え装置

本発明において、試薬パッドに塗布した懸濁液の水性部分（例えば、血液）が反射率を測定するパッド表面に移動した時に生ずる反射率の降下を測定することにより、反射率回路自体を、計時を

開始するのに使用することができる。一般的には、測定装置は「レディ」モードで始動し、一般的にオフホワイトの實質的に乾燥状態にある未反応試薬ストリップからの反射率を近接した時間間隔（一般的に約0.2秒）で自動的に読み取る。最初の測定は、通常、分析すべき流体がマトリックスに浸透する前であって、且つ流体を試薬要素の反射率を測定する以外の位置に塗布した後に行われる。得られる反射率の値は、マイクロプロセッサで評価される。この際、一般に、連続したデータをメモリに記憶し、その後各値を最初の未反応の値と比較して評価が行われる。水溶液が試薬マトリックスに浸透すると、反射率の降下により測定時間間隔の開始の信号が送られる。5〜50%、一般には約10%の反射率の降下により計時が開始されるようになっている。このような簡便な方法により、使用者が何ら操作を行わなくても、測定媒体が反射率測定が行われる表面への到達時と一連の読み取りの開始時との正確な同調がなされる。

本明細書に述べられているシステムが、特にポリアミドマトリックスを使用した物と、このようなマトリックスをグルコース及び他の生物由来物質などの種々の糖の濃度の定量に使用したものに向けられているが、本発明の反射率切り換え装置はこれらのものに何ら限定されるものでない。例えば、反射率切り換え装置で用いられるマトリックスは、水不溶性の親水性物質のいずれから形成してもよく、又、このシステムを他の反射率アッセイに用いてもよい。

グルコースアッセイへの特定の利用

赤血球の存在下におけるグルコースの検出に関する特定な一例を以下に示し、本発明を詳細に説明するとともに、その特有の利点について説明する。以下の例は、本発明の好ましい一態様であるが、本発明は、血中のグルコースの検出に限定されるものではない。

試薬要素の形成にポリアミド表面を用いると、本発明における多数の好ましい特性が得られる。即ち、試薬が親水性あり（つまり、試薬及び試料

を容易に吸収する）、ぬれても変形せず（従って、反射率読み取りに適した平らな表面である）、耐薬と相溶性があり（良好な保存性を付与するのに必要である）、膜の単位容積当たりの試料吸収容量が限定されており（大きなダイナミックレンジで測定値を表すのに必要である）、及び通常の方法で製造できるに十分な湿潤強度を示す。

一般的な構成では、この方法は、プラスチック型ホルダー及び試薬要素（シグナル生成系を含ませたマトリックス）からなる装置を用いて行われる。試薬要素を製造用として好ましく用いられるマトリックスとしては、ナイロン製精密濾過膜、特に、ポリエステルの不織布濾過膜のコアーにナイロン66をキャストして製造した膜を挙げることが出来る。この種のナイロン製精密濾過膜で平均孔径が0.1〜3.0 μ mのものが非常に数多くボール・ウルトラファイン・フィルトレーション・コーポレーション(Pall Ultrafine Filtration Corporation)から市販されている。これらの材料は、高強度を示し、且つ水に暴露したり、急速にぬら

しても良好な柔軟性及び寸法安定性を示す。

ナイロンの特定の化学構造を変えた種々のものも使用可能である。これらのものとしては、例えば、帯電した末端基を有する非官能性ナイロン66（ボール・ウルトラファイン・フィルトレーション・コーポレーション（以下「ボール社」と称する）によりアルチポーア（Ultipore）の商標で販売されている）が挙げられる。正の電荷ではpH6未満となり、一方負の電荷ではpH6以上となる。他の膜の場合、膜生成に先立ち、ナイロンに官能基を導入し、膜に異なった特性を付与する場合もある。カルボキシ基により官能性を付与したナイロン（ボール社により「カルボキシジン（Carboxydine）」として販売されている）の場合、広いpH範囲にわたって負に帯電する。又、ナイロンの表面を高密度の正に帯電した基、一般的には第4アミン基により官能性を付与することもでき（ボール社により「ポジジン（Posidyne）」として販売されている）、その場合、広いpH範囲にわたってほとんど電荷の変化を示さない。このような材料は、

本発明を実施するのに特に適している。又、タンパク質を共有的に固定出来るように設計された反応性官能基を有する膜（ボール社によりバイオジン・イムノ・アフィニティ・メンブレン（Biodyne Immuno Affinity membrane）として販売されている）を使用することもできる。このような材料は、試薬として使用するタンパク質、例えば、酵素を共有結合するのに用いることができる。これらの材料は全て使用可能であるが、正に帯電した高密度の基を表面に有するナイロンを使用すると、乾燥試薬パッドに形成した時に最も優れた安定性が得られる。非官能性ナイロンが次に安定性に優れ、カルボキシ化ナイロンがその次に安定性に優れている。

全血液の分析に用いる場合には、約0.2～2.0mmの範囲、好ましくは約0.5～1.2mmの範囲、最も好ましくは約0.8mmの孔径を有するものから所望の結果が得られる。

試薬要素を取り付けるハンドルの形状については、あまり重要ではなく、試料が試薬要素の一面

にアクセスでき、又、反射率を測定する入射光が試薬要素の他面にアクセスできればよい。又、ハンドルは、試薬要素を光学系と位置合わせして吸光度測定装置に挿入するのに役立つ。好ましいハンドルの一例として3M465あるいはY9460転写接着剤などの転写接着剤を塗布したマイラーあるいは他のプラスチックストリップが挙げられる。転写接着剤を介してプラスチックに穴をあける。次に、一般的に薄いパッドの形状をしており、試薬を含有しているか、あるいは後で試薬を添加する試薬要素を転写接着剤により貼り付ける。この際試薬要素は、ハンドルにおけるハンドルと転写接着剤を貫通して形成した穴の周囲の部分にしっかりと取りつける。このような装置を第1図に示す。第1図は、接着剤13によりマイラー製ハンドル12に取り付けた試薬パッド11を示す。穴14により、試料あるいは入射光が試薬パッドの一面にアクセスできるとともに、試薬パッドの他面へのアクセスも自由である。試薬パッド及びハンドルに関する全ての寸法は、試薬パッドが、反射率

読み取り機器の光源及び反射光検出器に近接した位置にしっかりとはめ込めるように選択する。

ナイロンマトリックスが試薬パッドを形成するのに用いられ、上記した厚さで使用する場合には、試薬パッドをホルダーで支持する際、試料を塗布し光の反射率を測定する位置において、ホルダーによって支持されていない部分がいずれの方向でも6mm以下であることが好ましい。支持されていない部分が、それ以上であると、膜の寸法安定性が不十分となり、膜表面での反射率測定に悪影響を及ぼす傾向がある。第1図に示すような試薬ストリップにおいて、穴14の直径が5mmの場合、非常によい結果が得られる。このような穴の最小直径については特に限定はないが、製造、試料塗布及び光の反射率の読み取りの容易性の面で、直径が少なくとも2mm以上であることが好ましい。

種々の色素がインジケータとして使用することが出来るが、その選択は、試料の性質による。アッセイ媒体として全血液を用いたり、あるいは他のアッセイ媒体を用いて溶液中の不純物を分析す

るような場合には、赤血球が光を吸収する波長とは異なる波長で吸収性を有する色素を選択するのが好ましい。HBTB-DHAB色素カップル(3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン塩酸塩と3-ジメチルアミノ安息香酸)は、酵素イムノアッセイにおけるペルオキシダーゼ反応用の発色に通していることが以前に記載されたことがあるが、商業的なグルコース測定試薬においては使用されていなかった。しかしながら、この色素カップルは、従来グルコース測定に用いられていたベンジジン誘導体などの色素に比較して、ダイナミックレンジが大きいだけでなく酵素安定性の面でも優れている。更に、HBTB-DHAB色素カップルは、ベンジジン誘導体のほとんどに特有の発がん性がない。

グルコースの測定に用いることのできる他の色素カップルとしては、AAP-CTA(4-アミノアンチピリンとクロモトロープ酸)カップルがある。このカップルは、HBTB-DHABほどダイナミックレンジは広くないが、安定であり、グルコースを測

定する場合における本発明の実施に用いるのに適している。更に、AAP-CTA色素カップルは、より広く用いられているベンジジン色素よりもダイナミックレンジが大きく且つ酵素活性の安定性に優れている。

HBTB-DHABカップルを使用すると、血液のヘマトクリット及び酵素化度についての補正がただひとつの補正率で可能となる。より一般的に用いられているベンジジン色素の場合には、そのような補正はできない。上記色素は、約635nmで吸収を示すが、700nmでは大きな吸収を示さない発色団を生成する。測定波長がわずかに変化(±約10nm)してもかまわない。700nmで血液の色を測定することで、ヘマトクリット及び酵素化度の両方が、測定できる。更に、635nm及び700nm両方での測定用の発光ダイオード(LED)が市販されており、簡単に設置の量産ができる。上述した好ましい孔径を有する膜を用い、且つ必要な試薬配合を行うことにより、ヘマトクリット及び酵素化の作用の両方が、700nmの単一波長で測定するこ

とにより補正できる。

次に示す更に2つの条件により、ポリアミドマトリックスについてのグルコースオキシダーゼ/ペルオキシダーゼ配合物の安定性及び保存性の面で特に向上が見られることが判明した。これらの条件とは、ひとつは、pH値を3.8~5.0、好ましくは3.8~4.3最も好ましくは4.0とすることであり、もうひとつは、試薬をマトリックスに塗布する際、高濃度緩衝液を用いることである。これに関して、10重量%クエン酸緩衝液が最も効果があり、5~15%の濃度で有効であることがわかった。これらは、試薬がマトリックスに塗布される際の緩衝液の重量/容積百分率である。他の緩衝液も上記と同様の重量/容積百分率基準で用いることができる。低いpH、好ましくは約pH4でHBTB-DHAB色素系を用い、且つ塗布溶液1ml当たり約500~1000単位(U)の高酵素濃度の場合に最も優れた安定性が得られる。

HBTB-DHAB試薬及びシグナル生成系の残部である酵素系を調製する際、下記に示す容積及び比率

により良好な結果が得られるけれども、正確にそれらの値を維持する必要はない。グルコースオキシダーゼが溶液中に約27~54容積%で存在し、ペルオキシダーゼが約2.7~5.4ml/mlの濃度で存在し、HBTBが約4~8ml/mlの濃度で存在し、且つDHABが約8~16ml/mlの濃度で存在するときには、試薬は容易にマトリックスパッドにより吸収される。DHAB-HBTBの重量比は、好ましくは(1~4):1、好ましくは約(1.5~2.5):1、最も好ましくは約2:1に維持される。

試薬要素の基本的な製造方法は、一度確立されると、容易である。膜自体は丈夫で安定であり、好ましい態様であるナイロン膜を用いた場合には、特にそのことが言える。試薬塗布には二種の溶液が必要だけであり、これらの溶液は、両方とも容易に配合され、且つ安定である。第一の溶液には一般に色素成分が含有され、一方、第二溶液には一般に酵素が含有される。HBTB-DHAB色素カップルを用いる場合、例えば、個々の色素を有機溶媒水溶液、一般に、アセトニトリルと水との1:

1 混合物に溶解する。マトリックスを溶液に浸漬し、液体の過剰分を吸い取って除去し、その後マトリックスを一般に50～60℃で10～20分間乾燥する。次に色素含有マトリックスを酵素を含有する水溶液に浸漬する。配合物の一般的なものとしては、ペルオキシダーゼ及びグルコースオキシダーゼ酵素の他に所望の緩衝液、防腐剤、安定剤等を含有したものが挙げられる。マトリックスから液体の過剰分を吸い取り、前記のようにして乾燥する。グルコース試薬の代表的配合例を下記に示す。

色素の浸漬

下記の試薬を混合する。

MBTB	40mg
DMAB	80mg
アセトニトリル	5ml
水	5ml

全ての固体が溶解するまで攪拌し、ガラス板あるいは他の平らな表面にそそぐ。ポジジン(Posidyne)膜(ボール社製)の一片を浸漬し、液体の過剰分を吸い取り、その後56℃で15分間乾燥する。

酵素の浸漬

下記の試薬を混合する。

水	6ml
EDTAの二ナトリウム塩	10mg
低粘性ポリペプ(Poly Pep) (シグマ社製)	200mg
クエン酸ナトリウム	0.668g
クエン酸	0.523g
6重量%ガントレッツ(Gantrez) AN-139 水溶液 (ジー・エイ・エフ(GAP) 社製)	2.0ml
セイロウワサビペルオキシターゼ(100単位/ml)	3.0ml
グルコースオキシダーゼ(2000単位/ml)	3.0ml

全ての固体が溶解するまで攪拌し、ガラス板あるいは他の平らな表面にそそぐ。上記において色素で浸漬した膜を浸漬し、液体の過剰分を吸い取り、その後56℃で15分間乾燥する。

反射率の読み取りを行うのに使用する電子装置には、少なくとも、光源、反射率検出器、増幅器、アナログ・デジタル変換器、メモリ、及びプログラムを格蔵したマイクロプロセッサ及び表示装置が内蔵されている。

光源は、一般には、発光ダイオード(LED)から構成されている。多色光源、及び二つの異なる波長で測定することのできる光検出器を使用することは可能であるが、装置が、二つのLED源あるいは二つの異なる波長の光を放出することのできる一個のダイオードを内蔵していることが好ましい。本明細書において、好ましい波長として記載されている波長を生ずる市販のLEDとしては、例えば、最大発光波長が635nmであるヒューレット・パッカード(Hewlett Packard)ALNP-1340及び最大発光波長が700nmであるヒューレット・パッカードQENT-1045が挙げられる。好ましい市販の光検出器としては、例えば、浜松(Hamamatsu)5874-18K及びリトロニクス(Litronix)BPX-65が挙げられる。

他の方法でも測定可能であるが、下記の方法により好ましい結果が得られる。即ち、計時開始後、所定の時間間隔で光検出器により読み取りを行う。635nm LEDは、反射率切り換え装置により示される開始時間約20秒後に始まる短い測定時間スパンの間だけ作動させる。もしこの読み取りにおいて、試料中に高濃度のグルコースが存在することが示された場合には、30秒の読み取りを行い、その結果を最終の計算に用いて精度を向上させる。一般的には、約250mg/μl以上の場合に高濃度であるとみなす。測定時間の開始約15秒後に700nmで読み取りを行い、バックグラウンドの補正を行う。適当なLEDを通常1秒未満作動させながら、光検出器からの読み取り値をその間隔で記録する。信号が増幅され、デジタル信号に変換した後、反射率の生の読み取り値をマイクロプロセッサによる計算に用いる。多くのマイクロプロセッサをこの計算に用いることができるが、ロックウェルインターナショナル社製のシングルボードマイクロコンピュータAIN 65が満足のいくもので

あることがわかった。本発明の方法及び装置により、手順を非常に簡単にすることが出来るとともに、使用者側の操作工程を最少にすることができる。使用に際して、試薬ストリップを、ストリップの穴と検出系の光学素子とを位置合わせするようにして検出器中に配置する。取り外し可能なキャップなどのカバーを、光学素子及びストリップにかぶせ、組立品を周囲光から遮蔽する。その後、測定装置上のボタンを押して測定シーケンスを開始し、マイクロコンピュータを作動させて、 R_{ss} を読み取りと称する未反応試薬パッドからの反射光の測定を行う。次に、キャップを外し、一箇の血液を試薬パッドに塗布するとともに、一般に、試薬パッドを光学素子及び読み取り装置と位置合わせする。この際、試薬ストリップを光学素子と正確に重ね合わせておくことが、操作を最少にする上で好ましい。血液などの試料が塗布されたことは、試料が、マトリックスを通過し、反射光を反対側で測定したときの反射率が減少するので、測定器により検知されることができる。反射率の減

少があったときは、本明細書の他の部分において詳細に説明してあるタイムシーケンスを開始する。測定すべき試料の種類にもよるが、カバーは、試料塗布後15秒以内に置かなければならない。血液試料中のグルコース濃度の測定の場合、一般に、血液を塗布してから約30秒後に結果が表示される。これに関して、試料中のグルコース濃度が $250\text{mg}/\text{dl}$ 未満の場合には、20秒の反応であってもよい。測定試料が、他のものである場合には、結果を表示する時点は、それぞれ異なってもよく、選択される試薬/試料の組み合わせの特性から容易に決定することができる。

バックグラウンド電流、即ち、作動しているが試薬パッドからの反射光がない状態での光検出器からの電流を用いて、バックグラウンドの補正を行い、グルコース濃度（あるいは他の測定すべき分析物）の特に正確な評価を行うことができる。本発明の好ましい態様に準じて製造した特定の測定器の場合には、2～3ヶ月の期間においても、この値は変化せず、従って、このバックグラウン

ドの読み取り値を定数としてコンピュータメモリにプログラムすることが可能であることがわかった。しかしながら、この方法をわずかに変更することにより、各分析でこの値を測定し、より正確な結果を得ることができる。要法では、試料ストリップを所定の位置に置く前に、蓋を閉めた状態で測定器のスイッチを入れ、バックグラウンド電流を測定する。その後、カバーを開けた状態で試験ストリップを測定器中に挿入し、 R_{ss} 測定を行い、その後、前記の操作を継続する。この要法では、バックグラウンド電流は、測定器の寿命を通して安定である必要はなく、従って、より正確な結果が得られる。グルコースアッセイの結果を計算するのに必要な生データは、前記のバックグラウンド反射率として報告されるバックグラウンド電流、 R_b 、前記の未反応試験ストリップの読み取り値、 R_{ss} 、及び終点の測定値である。本明細書に記載の好ましい態様を用いた場合、終点はあまり安定ではなく、最初の血液塗布から正確に計時しなければならない。しかしながら、ここ

に述べる測定器では、この計時を自動的に行う。 $250\text{mg}/\text{dl}$ 未満のグルコース濃度の場合、20秒以内で十分に安定な終点に達し、最終反射率、 R_{ss} 、が測定される。又、 $450\text{mg}/\text{dl}$ 以下のグルコース濃度の場合には、30秒での反射率の読み取り、 R_{ss} 、が通している。ここに述べるシステムでは、最大 $800\text{mg}/\text{dl}$ 迄のグルコース濃度では、明瞭な表示が可能であるが、 $450\text{mg}/\text{dl}$ を超える濃度では、重大な問題を生じるほどではないが、いくらかノイズが多くなり不正確になる。このようにグルコース濃度が高い場合には、反応時間を長くすることで、読み取り値の精度が良くなる。二波長測定用の 700nm での反射率の読み取りは、一般に、15秒（ R_{15} ）で行われる。この時までには、血液は、完全に試薬パッドにしみ込む。15秒以上の同色素反応は継続し、少しだけ 700nm での読み取りで検知される。従って、 700nm での色素の吸収信号は、悪影響を及ぼすので、15秒を超える場合の読み取り値は、計算では無視される。前記の生データは、反射率測定値よりも容易に

視覚化できる、グルコース濃度に比例するパラメータを計算するのに用いられる。必要に応じて、透過率分光分析法（ベールの法則）における吸光係数と分析物濃度との関係に類似した、反射率の対数変換を用いることができる。即ち、反射率分光分析法に関して具体的に導き出されたクベルカモンクの式の簡略化したものが、特に有効であることが判明した。式1により定義される導関数 K/S が、分析物濃度に関連する。

$$K/S - t = (1 - R_0 t)^2 / (2 \times R_0 t) \quad (1)$$

但し、 $R_0 t$ は、特定の終点時、 t に測定された反射能であり、式2に述べる入射光線の吸収率である。

$$R_0 t = (R_0 - R_{\infty}) / (R_{0\infty} - R_{\infty}) \quad (2)$$

但し、 $R_0 t$ は終点時の反射率、 $R_{0\infty}$ 又は R_{∞} である。

$R_0 t$ は、反射光が無い場合のゼロ (R_0) から全反射光の場合の1 ($R_{0\infty}$) の範囲で変化する。計算に反射能を用いると、高度に安定な光源及び検出回路が不要となるので、測定器の設計が非

常に簡単になる。この理由は、これらの成分は、 $R_{0\infty}$ 及び R_0 の測定により制御できるからである。

単一波長読み取り値 K/S は、20秒 ($K/S - 20$) 又は30秒 ($K/S - 30$) で計算できる。これらのパラメータを YSI (イエロー・スプリングス・インストルメンツ (Yellow Spring Instruments)) グルコース測定値と関連づける検量線は、式3の3次多項式によって明確に表すことができる。

$$YSI = a_0 + a_1 (K/S) + a_2 (K/S)^2 + a_3 (K/S)^3 \quad (3)$$

これらの多項式の係数を表1に示す。

表 1

単一波長検量線の3次多項式適合係数

	$K/S - 20$	$K/S - 30$
a_0	-55.75	-55.25
a_1	0.1632	0.1334
a_2	-5.765×10^{-3}	-2.241×10^{-3}
a_3	2.58×10^{-6}	1.20×10^{-6}

好ましい態様において測定される単一化学種は、 $MBTH-DHAB$ インドミン色素であり、分析されるマトリックス複合体は、0.8 μm のポシジン (Posidye membrane) に分布した全血液である。

シーアールシー、クリティカル・レビューズ・イン・フード・サイエンス・アンド・ニュートリション (CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition)、12(3)203-30 (1983) に記載されている「アプリケーション・オブ・ニア・インフラ・レッド・スペクトロフォトメトリー・トゥ・ザ・ノンデストラクティブ・アナリシス・オブ・フーズ (Application of Near Infra Red Spectrophotometry to the Nondestructive Analysis of Foods): ア・レビュー・オブ・エクスペリメンタル・リザルツ (A Review of Experimental Results)」と題した報告では、光学密度差 ΔOD

($\lambda_1 - \lambda_2$) の測定を基盤とした測定器の使用についての記載がある。ここで、 $OD \lambda_1$ は、測定すべき成分の最大吸収に相当する波長の光学密度であり、 $OD \lambda_2$ は、該成分があまり吸収を示さな

い波長の光学密度である。

二波長測定の場合の計算法は、当然のことながら、単一波長測定の場合よりも複雑であるが、はるかに効果的である。700nmの読み取りによっておこなう第1次補正により、血液に起因するバックグラウンド色を差し引く。この補正を行うために、血液の色に起因する635nmと700nmでの吸光度の間の関係が、広範囲の血液の色にわたって、グルコースを含まない血液試料を測定して求めた。この色の範囲は、ヘマトクリットを変化させて作り出したところ、かなりの直線関係が観察された。これらの直線より、700nmの $K/S - 15$ を標準化して、635nmの $K/S - 30$ と等価にした。この関係を式4に示すが、ここで $K/S - 15n$ は標準化した700nmの $K/S - 15$ である。

$$K/S - 15n = (K/S - 15 \times 1.54) - 0.133 \quad (4)$$

これに関連して、標準化した700nmの信号と635nmの信号の等価性は、グルコース濃度がゼロの時のみにあてはまることに留意しなければならない。検量線を作成するための式が式5及び式6

により示される。

$$K/S-20/15 = (K/S-20) - (K/S-15n) \quad (5)$$

$$K/S-30/15 = (K/S-30) - (K/S-15n) \quad (6)$$

これらの曲線は第4次多項式に最もよく適合しており、 K/S における第4次項を式3に追加したものに類似している。これらの式に関する、コンピュータに適合した係数を表2に示す。

表 2

二波長検量線の第4次多項式適合用係数

	$K/S-20/15$	$K/S-30/15$
a.	-0.1388	1.099
a ₁	0.1064	0.05235
a ₂	6.259×10^{-6}	1.229×10^{-4}
a ₃	-6.12×10^{-9}	-5.83×10^{-9}
a ₄	3.21×10^{-11}	1.30×10^{-11}

クロマトグラフィー効果に起因する誤差を排除するための第2次補正の方法も開発された。ヘマトクリットの低い試料は、同様の 635nm の読み取

り値を有するヘマトクリットの高い試料と比較して、700nm の読み取り値が低い特徴を有している。 $(K/S-30)/(K/S-15)$ の比を、広範囲のヘマトクリット及びグリコース濃度にわたって、 $K/S-30$ に対してプロットすると、得られるグラフの線が、クロマトグラフィー効果を示す試料（曲線より上）と示さない試料（曲線より下）との間の境界を示している。曲線より上の試料の場合の $K/S-30$ は、同様の $(K/S-30)/(K/S-15)$ 比を有する曲線上の点に一致するまで読み取り値を上昇させて補正する。

上記の補正率は、ひとつの測定器を種々の配合物に適合させるようにしたものであった。この計算方法は、個々の測定器及び試薬ごとに、上記と同様の方法により最適化することができる。

要するに、本発明のシステムにより、オペレータの動作をできる限り少なくでき、従来の反射率読み取り法に対して多数の利点がある。例えば、血中のグルコースを定量する場合について、従来法と比較した場合、次のような明らかな利点がい

くつかある。まず、薄い試薬パッドにしみ込ますために必要な試料の量が少なくてすむ（一般に 5～10 μl）。第2に、オペレータに必要な時間は、試料を薄い親水性膜に塗布するのに要する時間とふたを閉めるのに要する時間だけである（一般に、4～7秒）。第3に、同時に計時する必要がない。第4に、全血を使用することができる。すなわち、本発明の方法では、赤血球の分離あるいは赤血球を含まない試料を使用する必要がなく、更に、他の着色の程度の大きい試料も使用できる。

又、全血液について本発明を実施すると、いくつかの予期できない利点が生じる。即ち、通常、水溶液（血液のような）は、親水性膜に浸透し、膜の反対側に液層を生じ、従って、表面が反射率測定には適さないものとなる。しかしながら、血中の赤血球及びタンパク質とマトリックスとの明らかな相互作用により、血液はポリアミドマトリックスを濡潤させるが、過剰の液体が多孔質マトリックスに浸透せず、従って、このマトリックスの反対側での反射率の読み取りを妨害しないこと

を見出した。

更に、本発明において使用される薄膜は、濡潤すると光を透過し、反射率測定装置に反射するのは弱い信号のみであると考えられる。一方、従来、光を十分に反射させるために、マトリックスの裏面に反射層を設けることが必要であると一般に考えられていた。他の場合には、測色に先立ち、試薬パッドの裏面に白色パッドを配置していた。本発明においては、反射層も白色パッドも必要としない。實際上、本発明は、一般的には、入射光がマトリックスに衝突する時には試薬要素の裏面に吸光性表面が存在する状態で実施される。試薬要素の裏面の吸光性表面と二つの異なる波長での反射率の測定との組み合わせの採用により、マトリックスから液体の過剰分を除去しなくとも満足のいく反射率の測定がなされ、従って、従来方法では必要とされていた工程をなくすることができる。

以下余白

(実施例)

本発明を一般的な観点から説明したが、本発明は、以下に示す具体的な実施例により、更によく理解できるであろう。しかしながら、以下に示す実施例は、本発明を説明する目的のみで述べるものであり、特記のない限り、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1再現性

一人の男性の血液試料 (JG、ヘマトクリット=45) を用いて、表 3～5 に示す再現性に関するデータを得た。

以下余白

YSI (mg/dl)	表 3 単一波長 M P X 系の再現性					
	平均 (mg/dl)		SD (mg/dl)		C.V. %	
	20秒	30秒	20秒	30秒	20秒	30秒
25	23.1	23.0	2.1	2.04	9.1	9.0
55	53.3	53.2	3.19	3.32	6.0	6.3
101	101	101	3.0	3.3	3.0	3.3
326	326.6	327	13.3	9.8	4.1	3.0
501		503		17.1		3.4
690		675		28		4.15
810		813		37		4.5

以下余白

表 4

二波長 M P X 系の再現性

YSI (mg/dl)	平均 (mg/dl)		SD (mg/dl)		C.V. %	
	20秒	30秒	20秒	30秒	20秒	30秒
25	25	27	1.34	1.55	5.4	5.7
55	55	57.4	2.58	2.62	4.7	4.6
101	101	101.5	2.55	2.18	2.5	2.1
326	332	330	15.0	7.1	4.5	2.1
501		505		21.3		4.2
690		687		22.8		3.3
810		817		30.4		3.7

表 5

口径 3.0 mm の場合の再現性

YSI (mg/dl)	C.V. %	
	4.7 mm	3.0 mm
55-100	4.8	4.9
300	3.0	5.0
600	3.8	5.5
平均	3.9	5.1

血液をアリコートに分けて、グルコースが 25～800 mg/dl の範囲で含有するようにした。500個のストリップ試料 (ロット No. FJ4-49B) からランダムに取ったストリップでの各グルコースレベルで、測定を 20 回ずつ行った。この試験の結果、次のような結論が得られた。

1. 単一波長と二波長の比較：二波長の場合、30秒で C.V. 値は 3.7% であったのに対し、単一波長の場合は 30秒で C.V. 値は 4.8% であり、25～810 mg/dl のグルコース濃度範囲で 2.3% の向上が見られた。又、25～326 mg/dl のグルコース濃度範囲では、C.V. 値が 3.3% 向上した。この時、C.V. 値が 5.4% から 3.6% に減少し、使用したグルコール濃度範囲において、顕著な向上が見られた。二波長 20秒の場合も、25～325 mg/dl の範囲における単一波長測定に比較して、C.V. 値において同様の向上が見られた (表 3 及び表 4 参照)。
2. 二波長における 20秒と 30秒との比較：25～100 mg/dl の範囲において得られた 20秒の場合の平均 C.V. 値は 4.2% であり、30秒の場合の

読み取り値 4.1 % とほぼ同じであった。しかしながら、 326 mg/dl において、30 秒の読み取り値が 2.1 % の C.V. であったのに対し、20 秒の場合 C.V. 値は 4.5 % であった。K/S-20 応答曲線から明らかなように、 250 mg/dl を超えると勾配が急激に減少し始める。このため、20 秒の場合、 300 mg/dl を超えるグルコース濃度での再現性が悪い。この再現性のデータから、20 秒の場合のカットオフ(cutoff)値が 100 mg/dl と 326 mg/dl の間にあることがわかる。後述する実施例 2 における回復性についての検討の結果から、カットオフ値が 250 mg/dl であることがわかった。

3. 口径の大きさ：上述したように、 3.0 mm ($5-0 \text{ min.}$) の小口径光学素子について検討した。10 回反復して手動浸漬した円板状試料を用いて行った最初の試験では、 3.0 mm の口径の場合、C.V. 値の向上が見られた。これは明らかに、光学系との位置合わせが容易であることによるものである。しかしながら、機械で作製したロール膜を使用した時、 4.7 mm の大きな口径の場合の平均

C.V. 値(表 5)は、上述したように 3.9 % であり、一方、口径 3.0 mm の場合の平均 C.V. 値は 5.1 % であった。この C.V. 値における 3.0 % の増加は、下記において述べるように、ロール膜の表面がでこぼこしていたためと思われる。

実施例 2

回復性：本発明の方法(MPX)とイエロー・スプリングス・インストルメント社(Yellow Springs Instrument Co.)(オハイオ州イエロー・スプリングス)製のイエロー・スプリングス・インストルメント 23A 型グルコースアナライザーを用いる代表的な従来方法とを比較するために、36 人の献血者の血液を試験した。献血者の人数は男性と女性が同数であり、又、血液のヘマトクリット値は 35~55% の範囲であった。血液試料は採血後 30 時間以内に、抗凝血剤としてのリチウムヘパリンとともに使用した。各血液試料をアリコートに分け、グルコース濃度 $0-700 \text{ mg/dl}$ の範囲となるようにして 152 の分析試料を調製した。各試料 2 回ずつ試験を行い、合計で 304 のデータを得た。

これらのデータから応答曲線を作製し、その後、適当な式を用いて計算した(表 1 及び表 2)。これらの MPX のグルコース値を Y S I 値に対してプロットし、散点図を作製した。
MPX 系の比較：20 秒及び 30 秒の測定時間の両方の場合において、単一波長散点図の方が二波長散点図よりも目で見たとこではバラツキが大きかった。20 秒での読み取り値は、 250 mg/dl を超えると大きなバラツキを示したが、30 秒での測定の場合には、グルコース濃度が 500 mg/dl 以上となるまでは大きなバラツキを示さなかった。これらの散点図は、種々のグルコース濃度範囲で、Y S I からの偏差を求めて定量化した。結果を表 6 に示す。

表 6

MPX 測定時 波長 間 (秒)	S.D. (mg/dl)	各濃度範囲における C.V. 値*			
		0-50	50-250	250-450	450-700
単一波長 20	± 5.6	7.2	14.5	-	-
単一波長 30	± 6.9	7.1	8.8	10.2	-
二波長 20	± 2.3	5.3	12.8	-	-
二波長 30	± 2.19	5.5	5.8	8.4	-

備考：これらの値はインター法(inter method)による C.V. 値である。

(イ) 二波長系の C.V. 値は単一波長系よりも 3.0 % 低かった。

(ロ) $0-50 \text{ mg/dl}$ において、単一波長系は、 $\pm 6-7 \text{ mg/dl}$ の S.D. 値を示したが、二波長系の S.D. 値は $\pm 2.2 \text{ mg/dl}$ にすぎなかった。

(ハ) 30 秒 MPX 測定の場合、カットオフ値は 250 mg/dl であった。50~250 の範囲では、20 秒及び 30 秒測定のインター法 C.V. 値は近似していた(単一波長の場合約 7 %、二波長の場合 5.5 %)。しかしながら、 $250-450 \text{ mg/dl}$ の範囲において、20 秒測定の読み取りが 2 倍を超えるインター法 C.V. 値を示し、単一波長では 14.5 %、二波長では 12.8 % であった。

(ニ) 30 秒測定の読み取り値は、 450 mg/dl を超える濃度では、単一波長及び二波長測定の両方(C.V. 値：10.2 % 及び 8.4 %)において使用不可能であった。

上記から明らかなように、上記の 2 つの MPX

系において、0 ~ 450 mg/dl の濃度範囲で最適な定量化を示した。

1. MPX 30二波長：この二波長系では、測定時間 30 秒で 95% の信頼限界 (Y S I の S D 値の 2 倍以内の測定値の確率) であり、50 ~ 450 mg/dl の範囲で 11.3% の C.V. 値を示し、0.5 ~ 5.0 mg/dl (表 7) の範囲で ± 4.4 mg/dl の S.D. 値を示した。

2. MPX 30/20二波長：この二波長系では、測定時間 20 秒でのグルコース濃度範囲が 0 ~ 250 mg/dl であり、測定時間 30 秒では 250 ~ 450 mg/dl の範囲であった。この場合の 95% 信頼限界はほぼ MPX 30二波長とほぼ同じであり (表 7)、50 ~ 450 mg/dl の濃度範囲で 11% の C.V. 値を示し、0 ~ 5.0 mg/dl の濃度範囲において、 ± 4.6 mg/dl の S.D. 値を示した。

以下余白

表 7

MPX、グルコスキャン・プラス及びアク・チェック bG⁺ 試薬ストリップに関する 95% 信頼限界の比較

測定範囲 mg/dl	MPX 単一波長		MPX 二波長	
	20 秒	30 秒	20 秒	30 秒
0 ~ 50	11.2	13.8	4.6	4.4
	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl
50 ~ 250	14.4%	14.2%	10.6%	11.0%
250 ~ 450	-	17.6%	-	11.6%
77 ~ 405	グルコスキャン・プラス (Glucose Scan Plus) (ドレクスラー・クリニカル (Drexler Clinical))			15.9%
77 ~ 405	アク・チェック bG (ドレクスラー・クリニカル)			10.7%
50 ~ 450	MPX 20/30二波長ハイブリッド			11.1%
50 ~ 450	MPX 二波長			11.3%

備考：* MPX に関する信頼限界は Y S I から求めた。グルコスキャン・プラス (Glucose Scan Plus)

及びアク・チェック (Acc-Check) bG に関する信頼限界は、検査操作成における小さな差異によるかたよりを排除するために、回帰方程式と Y S I との対比から求めた。

実施例 3

安定性の最適化についてのベンチスケール実験のほとんどを、手動浸漬した 0.8 mm の円板状ポシジン膜 (Posidyne membrane) を用いて行った。上記した特定の色素/酵素配合を用いた。

1. 室温安定性：この実験は、0.8 mm のポシジン膜試薬を 18 ~ 20℃ でシリカゲル乾燥剤で乾燥しながら貯蔵した場合の変化を図表化するためのものである。2.5 ヶ月後に、室温試料を 5℃ で貯蔵した試料を対比して測定した結果、何ら顕著な変化を示さなかった。作成した散点図から、0 ~ 450 mg/dl のグルコース濃度範囲が得られた。

2. 37℃での安定性：37℃での安定性の実験を室温 (RT) 安定性試験と同様の試薬を用いて行った。接着剤を使用した場合と使用しない場合それぞれについてのストリップについて、37℃

で応力をかけた試薬のグルコース値と室温で応力をかけた試薬のグルコース値の差を時間に対してプロットした。その結果、手製のストリップのために再現性が悪いことから、データにばらつきが見られたが、接着剤を使用して応力をかけたものも接着剤を使用しなかったものも両方とも優れた安定性を示した。

3. 5.6℃での安定性：円板状膜について、同様の銘柄であるが配合の異なる 8 種のものを用いて (表 8)、5 ~ 6 日間の安定性試験を行った。グルコース濃度が低い場合 (80 ~ 100 mg/dl)、応力をかけると、平均グルコース値は 3.4% 低下し、最大低下率は 9.55% であった。一方、グルコース濃度が高い場合 (280 ~ 320 mg/dl)、グルコース値は平均で 3.4% 低下し、このときの最大低下率は 10.0% であった。

以下余白

表 8

pH = 4.0 及び 4.8 のポシジン円板状試薬品に
56℃で5～6日間応力をかけた場合の安定性

試料No	56℃試料と室温試料との差 (%)	
	YSI(80-100 mg/dl)	YSI(280-320 mg/dl)
FJ22B	-6.25	+5.4
FJ27A	-4.0	-5.14
FJ28B	-2.4	-5.3
FJ30H	-9.55	-10.0
FJ31C	+4.43	-1.24
FJ36	-3.2	-8.5
FJ48B*	-3.0	0.0
GM48A*	-3.0	-2.5

8個のデー

タの平均 -3.4 -3.4

備考：*これらの2つの試料の酵素及び色素の濃
度は、通常のものの2倍である。

この膜を56℃で19日間応力をかけたところ、
緩衝剤の使用、不使用にかかわらず大きな差がな
かった。両方の場合において、19日間における

グルコース値の減少は低濃度 (80～100mg/dl)
及び 300mg/dl で15%未満であった。

別に、通常の2倍の酵素及び色素濃度を有する
手動浸漬した0.8μポシジン膜を用いて56℃で
の実験を行った。同じ銘柄であるが異なる配合の
ものを作製し、14日間にわたって安定性を測定
した。これら2つの実験の結果の平均値をプロッ
トした。14日間における変化は、高濃度及び低
濃度グルコースの両方について、±10%以内で
あった。これらのデータからこの銘柄のものが特
に安定であることがわかる。

実験例4

試料の大きさ：

M P Xに関する試料サイズの要件を表9に示す。
以下余白

表 9

サンプルサイズのM P X測定への影響

試料 サイズ (μl)	二 波 長										平均値	
	平均値											
	低グルコース YSI=56											
3	41	50	39	31	40	31	42	30	19	30		
4	44	49	49	49	48	41	45	44	45	44		
5	54	48	49	51	50	50	49	48	49	49		
10	48	48	50	47	48	54	53	56	55	54		
20	49	49	49	50	49	55	57	58	60	58		
	高グルコース YSI=360											
3	301	260	276	286	280	274	232	244	260	252		
4	383	378	367	341	367	361	356	342	318	344		
5	398	402	382	370	388	378	387	366	351	370		
10	364	362	378	368	368	356	358	379	369	366		
20	375	370	380	378	376	380	382	389	385	384		

上記の表に示した容積の試料を第1図に示す試
薬パッドにマイクロビペットで移した。フィガー
スティックで血液をストリップに塗布したときは、

試料の全量に移すことはできない。従って、ここ
に示した容積は、分析のために指から絞り出す必
要のある試料サイズの合計量を表わすものではない。
試料パッドの円周を完全におおうに必要な試
料の最少量3μlである。この程度の量では、試薬
パッドを完全に飽和させることができず、M P X
測定では低い値となる。4μlの試料量でようやく
試料パッドを飽和させることができ、5μlの試料
量が飽和に十分な量である。10μlの試料量はめ
れてひかる程度の液滴であり、20μlの試料量は
非常に大きな液滴であり、ビペットで血液をサン
プリングする時のみ用いる。

単一波長の場合、低グルコース濃度では、得ら
れる結果はいくぶん試料サイズに依存するが、二
波長測定ではこのようなことは全くない。単一波
長の場合のこのような依存性は許容できる程度の
ものと考えられるが、好ましくないことは明らか
である。

以下余白

実施例5

再現性

上記の測定実験を、一点のデータ当り通常2、3又は4回測定をくり返した。これらの一連のデータは、例えば、ヘマトクリットあるいは酸素濃度が極端に高い場合においてさえ、よく近似していた。又、C.V.値は5%をはるかに下まわっていた。従って、再現性が非常に良好であると思われる。

(発明の効果)

本発明は、現在市販されているシステムや文献に記載されているシステムに対して数多くの利点を有している。即ち、プロトコールが簡単であり、ほとんど技術的熟練を要せず、且つオペレータにより発生する誤差が比較的小さい。又、このアッセイは、家庭において使用する物質について考慮すべき重要な事項を満足しており、迅速に行うことができるばかりでなく、使用する試薬は、安価で且つ比較的無害のものである。得られる結果は使

用者にとって理解可能なものであり、使用者はその結果を継続治療に併せて利用することができる。更に、試薬は保存性に優れているので、長期間にわたって信頼性のある結果を得ることができる。又、装置が簡単であり、信頼性に優れ且つ実質的に自動である。

本明細書において具体的に言及した全ての特許及び文献は、本発明の属する分野における当業者の技術水準を示すものであり、そこに記載されている事項は必要に応じて本発明に利用できる。

ここに詳述した本発明は、特許請求の範囲に記載した発明の精神及びその範囲から逸脱することなく、数多くの変形と変更を行うことができることは、当業者の当然とするところである。

4. 図面の簡単な説明

第1図は分析すべき液体を塗布した反応パッドを含む試験装置の一態様の斜視図であり、第2図は本発明の実施に用いることのできる装置の概略を示すブロック図であり、第3図は本発明の実施に用いることのできる他の装置の概略を示すブ

ック図である。

- 11…試薬パッド、
- 12…ハンドル、
- 13…接着剤、
- 14…穴、
- 15…光検出器、
- 16…増幅器、
- 17…軌道・保持回路、
- 19…アナログ・デジタル変換器、
- 20…マイクロプロセッサ、
- 21…プログラム・アンド・データメモリ、
- 22…表示装置。

特許出願人

ライフスキャン、インコーポレイティド

特許出願代理人

弁理士 骨 木 朗
 弁理士 西 舘 和 之
 弁理士 石 田 敬
 弁理士 森 田 憲 一
 弁理士 山 口 昭 之
 弁理士 西 山 雅 也

図面の浄書(内容に変更なし)

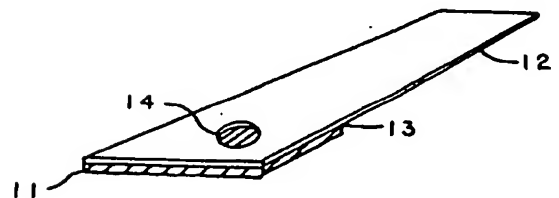


FIG. 1

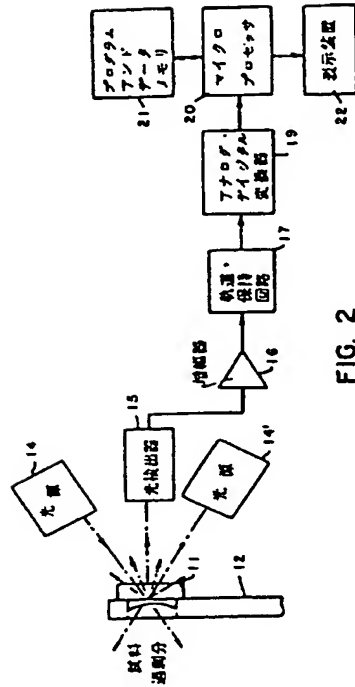


FIG. 2

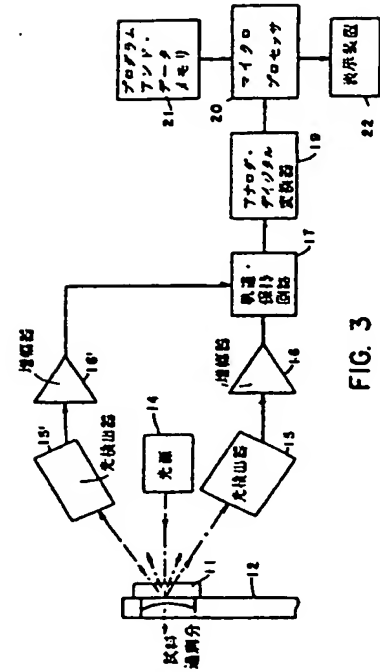


FIG. 3

第1頁の続き

④発明者 レイ アンダーウッド

アメリカ合衆国、カリフォルニア 96080、レッドブラ
フ、ペインズ クリーク ロード 146005

特開昭63-101757 (22)

手 続 補 正 書 (方式)

昭和62年11月12日

特許庁長官 小 川 邦 夫 殿

1. 事件の表示

昭和62年特許願第200079号

2. 発明の名称

分析物の測定装置及び分析物濃度の定量方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ライフスキャン、インコーポレイティド

4. 代 理 人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号

御光虎ノ門ビル 電話 504-0721

氏名 弁護士 (8579) 青 木 剛 (外5名)

5. 補正命令の日付

昭和62年10月27日 (発送日)

6. 補正の対象

- (1) 願書の「出願人の代表者」の欄
- (2) 委任状
- (3) 明細書
- (4) 図面

7. 補正の内容

- (1)(2) 別紙の通り
- (3) 明細書の浄書(内容に変更なし)
- (4) 図面の浄書(内容に変更なし)

8. 添附書類の目録

- | | |
|-------------|-----|
| (1) 訂正願書 | 1通 |
| (2) 委任状及び訳文 | 各1通 |
| (3) 浄書明細書 | 1通 |
| (4) 浄書図面 | 1通 |

